Journal of Water and Wastewater, Vol. 31, No.3, pp: 68-76

Prevalence Assay of Antibiotic Resistance in *Enterobacteriaceae* Isolated from Hospital and Urban Wastewaters in Karaj City

M. Afshari[1], A. Haddadi[2], M. Shavandi[3]

1. Former Graduate Student of Microbiology, Dept. of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran
2. Assist. Prof., Dept. of Microbiology, Karaj Branch, Islamic Azad University, Karaj, Iran
(Corresponding Author) haddadi@kiau.ac.ir
3. Assist. Prof., Ecology and Environmental Pollution Control Research Group, Research Institute of Petroleum Industry, Tehran, Iran

(Received March 11, 2019 Accepted Aug. 24, 2019)

To cite this article:
Afshari, M., Haddadi, A., Shavandi, M. 2020. "Prevalence assay of antibiotic resistance in *enterobacteriaceae* isolated from hospital and urban wastewaters in Karaj city" Journal of Water and Wastewater, 31(3), 68-76. Doi: 10.22093/wwj.2019.174603.2841 (In Persian)

Abstract

Hospitals are hotspots for antimicrobial-resistant bacteria and will be expelled from hospitals via wastewater systems. In this study, we present ESBLs prevalence in Entrobacteriaceae strains isolated from hospitals and urban wastewaters in Karaj.A total of 100 Entrobacteriaceae strains were isolated from hospitals and urban wastewater in Alborz province during the summer of 2018. Bacterial strains were identified by standard microbiological and biochemical tests. The antimicrobial susceptibility test was determined according to Kirby Baur assay. ESBLs producers were screened by disc diffusion and combined disc and were studied by using specific primers for bla_{TEM} and bla_{SHV} genes. Among the organisms cultured, *Escherichia coli* (73%) was the most common organism followed by *Klebsiella oxytoka* (7%). Antibiotic resistance patterns were observed as follows: cefotaxim 26%, ceftriaxone 21%, ceftazidim 15% and cefepim 9%. Thirteen percent of isolates were detected as ESBLs producers. Based on the PCR results the frequency of bla_{TEM} and bla_{SHV} among the ESBLs producer isolates were 92.3% and 100% respectively. Antimicrobial resistance should now be seen as an environmental pollutant and new wastewater treatment processes must be assessed for their capability in eliminating antimicrobial-resistant bacteria, especially from hospital effluents.

Keywords: ESBL, *Entrobacteriaceae*, Wastewater, Antibiotic Resistance.

۶۹ dx.doi.org/10.22093/wwj.2019.174603.2841

مجله آب و فاضلاب، دوره ۳۱، شماره ۳، صفحه: ۷۶-۶۸

بررسی شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی در *انتروباکتریاسه‌های* جداسازی شده از فاضلاب‌های شهری و بیمارستانی شهر کرج

مریم افشاری[۱]، اعظم حدادی[۲]، محمود شوندی[۳]

۱- دانش‌آموخته کارشناسی ارشد گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران
۲- استادیار، گروه میکروبیولوژی، واحد کرج، دانشگاه آزاد اسلامی، کرج، ایران
۳- استادیار، گروه حفاظت محیط زیست، پژوهشگاه صنعت نفت، تهران، ایران
haddadi@kiau.ac.ir (نویسنده مسئول)

(دریافت ۹۷/۱۲/۲۰ پذیرش ۹۸/۶/۲)

برای ارجاع به این مقاله به صورت زیر اقدام بفرمایید:
افشاری، م.، حدادی، ا.، شوندی، م. ۱۳۹۹، "بررسی شیوع مقاومت آنتی بیوتیکی در *انتروباکتریاسه‌های* جداسازی شده از فاضلاب‌های شهری و بیمارستانی شهر کرج" مجله آب و فاضلاب، ۳۱(۳)، ۷۶-۶۸. **Doi: 10.22093/wwj.2019.174603.2841**

چکیده

بیمارستان‌ها نقاط کانونی برای باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک‌ها هستند که از طریق سیستم فاضلاب به بیرون دفع می‌شوند. در این پژوهش شیوع آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف (ESBLs) در گونه‌های *انتروباکتریاسه* جداسازی شده از فاضلاب‌های بیمارستانی و شهری کرج بررسی شد. ۱۰۰ ایزوله *انتروباکتریاسه* از فاضلاب‌های بیمارستانی و شهری کرج در طول تابستان سال ۱۳۹۷ جداسازی شدند. باکتری‌ها به وسیله تست‌های بیوشیمیایی و میکروبیولوژیکی شناسایی شدند. تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی به وسیله روش Kirby Baur انجام شد. تولیدکنندگان ESBLs با استفاده از آزمون دابل دیسک دیفیوژن توسط دیسک‌های ترکیبی مشخص شدند و با استفاده از پرایمرهای اختصاصی، شیوع ژن‌های bla_{TEM} و bla_{SHV} بررسی شد. در میان ارگانیسم‌های کشت شده بعد از *اشریشیا کلی* (۷۳ درصد)، *کلبسیلا اوکسی توکا* (۷ درصد) شایع‌ترین ارگانیسم بود. الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی به‌صورت زیر مشاهده شد: سفوتاکسیم ۲۶ درصد، سفتازیدیم ۱۵ درصد، سفتریاکسون ۲۱ درصد و سفپیم ۹ درصد. در مجموع ۱۳ درصد از ایزوله‌ها مولد ESBLs بودند، که بر اساس نتایج حاصل از PCR، 12 ایزوله (۹۲/۳ درصد) واجد ژن bla_{TEM} و تمامی ۱۳ ایزوله (۱۰۰ درصد) واجد ژن bla_{SHV} بودند. مقاومت آنتی‌بیوتیکی امروزه باید به‌عنوان یک آلودگی محیط زیستی در نظر گرفته شود و توانایی فرایندهای جدید تصفیه فاضلاب در از بین بردن باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک، به‌ویژه از پساب‌های بیمارستانی، ارزیابی شود.

واژه‌های کلیدی: ESBL، انتروباکتریاسه، فاضلاب، مقاومت آنتی‌بیوتیکی

۱- مقدمه

فاضلاب بیمارستانی کیفیت مشابهی با فاضلاب شهری دارد، با این تفاوت که حاوی انواع مواد شیمیایی خطرناک است (Takdastan et al., 2017).

فاضلاب بیمارستان، فاضلاب تولید شده از همه فعالیت‌های بیمارستان (فعالیت‌های پزشکی و غیر پزشکی) از جمله فاضلاب‌های تولید شده در بخش‌های اورژانس، کمک‌های اولیه، رادیولوژی، آشپزخانه و خشکشویی است. فاضلاب بیمارستان شامل آلاینده‌های مضر از جمله بقایای داروها، مواد شیمیایی آزمایشگاهی (آنتی‌بیوتیک، فنل، کلروفرم)، مواد شیمیایی سمّی، مواد آلی تجزیه‌پذیر و میکروارگانیسم‌های بیماری‌زا به‌ویژه خانواده

dx.doi.org/10.22093/wwj.2019.174603.2841

انتروباکتریاسه است (Prayitno et al., 2013).

*انتروباکتریاسه*ها باکتری‌های گرم منفی میله‌ای هستند که به میزان زیادی در طبیعت انتشار دارند. این میکروارگانیسم‌ها، مهم‌ترین پاتوژن‌های فرصت‌طلب بوده و مسبب عفونت‌های ادراری، سپتی سمی و پنومونی هستند. بتالاکتام‌ها، به‌ویژه سفالوسپورین‌های وسیع‌الطیف، کاربا‌پنم‌ها و فلوروکینولون‌ها از اهداف درمانی برای درمان عفونت‌های ایجاد شده توسط *انتروباکتریاسه‌ها* هستند (Ghane, 2015).

یکی از مکانیسم‌های مهم پیدایش مقاومت نسبت به داروهای بتالاکتام، تولید بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف[1] است که این آنزیم‌ها با هیدرولیز حلقه بتالاکتام در ساختار داروهای بتالاکتام، مانع از فعالیت ضد میکربی آنها شده و منجر به ایجاد مقاومت میکروارگانیسم‌ها به داروهای بتالاکتام وسیع الطیف می‌شود (Karimi et al., 2018).

بروز مقاومت باکتریایی در محیط‌های آبی در بسیاری از مطالعات مختلف گزارش شده است از این‌رو بسیاری از پژوهشگران، محیط‌های آبی به‌خصوص فاضلاب را به‌عنوان دریافت کننده اصلی باکتری‌های روده، جایگاهی مساعد برای مقاوم شدن بسیاری از باکتری‌ها در مقابل انواع گوناگون آنتی‌بیوتیک‌ها می‌دانند زیرا در چنین محیطی انتقال ژن‌های مقاوم به‌دلیل زیاد بودن بار غذایی و بار میکربی به‌خوبی بین گونه‌های مختلف باکتریایی صورت می‌پذیرد. انتقال افقی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی در محیط یکی از دلایل اصلی ظهور و گسترش باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک است که در پژوهش‌های زیادی به آن اشاره شده است. از آنجایی که کلیفرم‌ها باکتری‌های غالب در فاضلاب‌ها هستند، انتقال افقی ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی (انتقال ماده ژنتیکی بین ارگانیسم‌ها) از طریق پلاسمیدهای قابل انتقال اغلب بین آنها اتفاق می‌افتد و این باکتری‌های مهم را به چندین آنتی‌بیوتیک مقاوم می‌سازد (گاهی اوقات به ۱۰ آنتی‌بیوتیک). مشکل اصلی این است که باکتری‌های کلیفرم به‌راحتی از طریق مسیر مدفوعی- دهانی در جوامع انتشار می‌یابند و باعث انتشار عفونت می‌شوند. آنها می‌توانند ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها را به باکتری‌های غیر مرتبط مثل *استافیلوکوکوس اورئوس* یا *سینتوباکتر* در سایر بخش‌های بیمارستان منتقل کنند، بنابراین مانع بزرگی بر سر راه درمان عفونت‌های ناشی از این باکتری‌ها یا سایر پاتوژن‌های بیمارستانی که این ژن‌های مقاومت را دریافت کرده‌اند، ایجاد می‌کنند (Shakibaie et al., 2009).

برای شناخت کامل گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی، لازم است بررسی وجود ژن‌های مقاوم نه تنها در کلینیک، بلکه در محیط‌های طبیعی نیز مورد توجه قرار گیرد. گمان می‌رود برون‌ریزهای تصفیه‌خانه‌های فاضلاب شهری از منابع اصلی انسانی برای انتشار آنتی‌بیوتیک‌ها، ژن‌های مقاومت آنتی‌بیوتیکی و باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک به محیط زیست هستند (Nikoogoftar Ranjbar et al., 2017).

فاضلاب‌های بیمارستانی دارای پتانسیل زیادی برای ورود باکتری‌ها و ژن‌های مقاوم به محیط زیست هستند. انتشار باکتری‌های مقاوم به آنتی‌بیوتیک و ژن‌های مقاومت به آنتی‌بیوتیک به داخل محیط زیست باعث افزایش دغدغه در ارتباط با سلامت عمومی شده است. مقاومت آنتی‌بیوتیکی در محیط زیست می‌تواند از باکتری‌های پاتوژن به باکتری‌های غیر پاتوژن منتقل شود (Aali et al., 2016).

تا به امروز بیش از ۲۰۰ نوع ESBLs از کشورهای مختلف گزارش شده که اغلب از *انتروباکتریاسه*ها جدا شده است (Haddadi and Yeke Fallah, 2017). از آنجا که اغلب این آنزیم‌ها باعث کاهش حساسیت به بتالاکتام‌ها می‌شوند و نیز ژن‌هایی که آنزیم‌های بتالاکتاماز را رمز می‌کنند متحرک بوده و ممکن است باعث انتشار آنها شود. بنابراین لازم است توجه بیشتری نسبت به آنها مبذول داشت. اغلب پژوهش‌ها در خصوص ژن‌های کد گذار ESBLs در *انتروباکتریاسه*ها، بر روی نمونه‌های بالینی متمرکز هستند (Dzierzanowska et al., 2010, Mansouri and Abbasi, 2015, Empel et al., 2008, Lim et al., 2009) و پژوهش‌های کمتری بر روی نمونه‌های محیطی صورت گرفته است.

در ایران نیز بررسی‌های بسیار محدودی برروی *انتروباکتریاسه*های دارای ژن‌های رمزکننده ESBLs در پساب‌های بیمارستانی انجام شده است (Ghane, 2015).

نظر به اهمیت فاضلاب‌های بیمارستانی در انتشار ژن‌های مقاومت، به ویژه ژن‌های ESBLs، هدف از این پژوهش بررسی

[1] Extended Spectrum Beta lactamases

مقایسه‌ای شیوع بتالاکتامازهای وسیع الطیف در ایزوله‌های *انتروباکتریاسه* جداسازی شده از فاضلاب‌های شهری و بیمارستانی در سطح شهر کرج است.

۲- روش پژوهش

۲-۱- جمع‌آوری نمونه

این پژوهش مقطعی- مشاهده‌ای روی نمونه‌های جمع‌آوری شده از فاضلاب‌های بیمارستانی (بیمارستان البرز و بیمارستان تخت جمشید) و فاضلاب شهری در طی یک دوره پنج‌ماهه از فروردین ۱۳۹۷ تا مرداد ۱۳۹۷ صورت گرفت. نمونه‌ها در بطری‌های استریل ۱۰۰ میلی‌لیتری جمع‌آوری و در کنار یخ به آزمایشگاه میکرب‌شناسی منتقل شدند و در کمتر از ۲ ساعت مورد آزمایش قرار گرفتند. یک میلی‌لیتر از هر نمونه فاضلاب به ۹ میلی‌لیتر سرم فیزیولوژی اضافه و به‌خوبی مخلوط شد. به‌منظور کاهش تعداد باکتری‌ها، از نمونه‌ها در محلول سالین تا رقت 10^{-6} نرمال رقت تهیه شد. سپس ۱۰۰ میکرولیتر از هر رقت در پلیت‌های حاوی محیط کشت[1] تلقیح شد و در انکوباتور ۳۷ درجه سلسیوس برای ۲۴ ساعت گرمخانه‌گذاری شد. شناسایی ایزوله‌ها بر اساس رنگ‌آمیزی گرام، انجام تست بیوشیمیایی و استفاده از محیط‌های افتراقی و اختصاصی انجام شد (Forbes et al., 2007).

پس از تأیید ایزوله‌های باکتریایی، این ایزوله‌ها برای مراحل بعدی این پژوهش به‌طور مطمئن نگهداری شدند، برای این کار از کلنی‌های منتخب کشت خالص تهیه شد و در محیط کشت (BHI Broth)[2] با ۱۵درصد گلیسرول، در ۱۵- درجه سلسیوس نگهداری شدند.

۲-۲- ردیابی فنوتیپی تولید آنزیم‌های بتالاکتاماز وسیع الطیف

طبق پیشنهاد CLSI[3] به‌منظور غربالگری اولیه ارگانیسم‌های مولد آنزیم ESBLs، از آزمون دیسک دیفیوژن استفاده شد. در این روش ابتدا پس از تهیه محیط کشت مولر هینتون آگار[4] ساخت شرکت میرمدیا، سوسپانسیون میکربی مطابق با غلظت استاندارد نیم مک فارلند شرکت بهارافشان تهیه و به‌طور کامل بر روی محیط مزبور پخش شد. سپس دیسک‌های آنتی‌بیوتیکی تهیه شده از شرکت پادتن طب شامل سفتازیدیم (۳۰ میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰ میکروگرم)، سفتریاکسون (۳۰ میکروگرم) و سفپیم (۳۰ میکروگرم) را به فاصله حداقل ۲۴میلی‌متر از یکدیگر بر روی محیط مزبور قرار داده شد و پس از ۱۶ تا ۱۸ساعت انکوباسیون در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، با استفاده از خط‌کش، هاله عدم رشد اطراف هر دیسک اندازه‌گیری و با استانداردهای جهانی CLSI مقایسه شد (Wayne, 2008).

ایزوله‌های مقاوم به نماینده‌های سفالوسپورینی برای تست تأییدی انتخاب شدند. برای این منظور از دیسک‌های ترکیبی استفاده شد. دیسک‌های سفتازیدیم (۳۰میکروگرم)، سفتازیدیم-کلاولانیک اسید (۱۰-۳۰میکروگرم)، سفوتاکسیم (۳۰میکروگرم)، و سفوتاکسیم-کلاولانیک اسید (۱۰ تا ۳۰میکروگرم)، تهیه شده از شرکت پادتن طب به فاصله حداقل ۲۴میلی‌متر از یکدیگر بر روی محیط قرار گرفته و پس از ۱۶ تا ۱۸ ساعت گرمخانه‌گذاری در دمای ۳۷ درجه سلسیوس، هاله عدم رشد اطراف دیسک حاوی کلاولانیک اسید به‌عنوان مهارکننده آنزیم‌های ESBLs نسبت به بدون کلاولانیک اسید سنجیده شد. در صورتی که اختلاف قطر هاله‌های عدم رشد بین دیسک‌های سفتازیدیم و سفتازیدیم-کلاولانیک اسید و همچنین بین سفوتاکسیم و سفوتاکسیم-کلاولانیک اسید ۵ میلی لیتر و بیشتر باشد، سویه مورد نظر را می‌توان بر طبق CLSI به‌عنوان مولد ESBLs در نظر گرفت. تمامی دیسک‌ها قبل از آزمایش با استفاده از سویه استاندارد *اشریشیاکلی* ATCC 25922 از لحاظ کیفیت کنترل شدند و نتایج با جدول ارائه شده توسط پروتکل CLSI مطابقت داده شد (Wayne, 2008). از سوش استاندارد *کلبسیلا پنومونیه* ATCC 700603 حاوی bla_{TEM} و bla_{SHV} به‌عنوان کنترل مثبت استفاده شد.

۲-۳- بررسی مولکولی شیوع ژن‌های bla_{TEM} و bla_{SHV}

استخراج DNA به روش جوشاندن انجام شد (Canton et al., 2008) و برای انجام واکنش PCR[5] مورد استفاده قرار گرفت.

[1] Eosin Methylene Blue (EMB)
[2] Brain Heart Infusion Broth
[3] Clinical Laboratory Standards Institute (CLSI)
[4] Muller- Hianton Agar (MHA)
[5] Poly Chain Reaction (PCR)

dx.doi.org/10.22093/wwj.2019.174603.2841

جدول ۱- توالی پرایمرهای مورد استفاده برای تکثیر ژن‌های bla_{TEM} و bla_{SHV}

Table 1. Primers used for PCR amplification of *bla* genes identification

Primer name	Sequence (5' to 3')	Expected amplicon size (bp)	Annealing temperature	Target gene
TEM-F TEM-R	GAGTATTCAACATTTCCGTGTC TAATCAGTGAGGCACCTATCTC	848	60	bla_{TEM}
SHV-F SHV-R	AAGATCCACTATCGCCAGCAG ATTCAGTTCCGTTTCCCAGCGG	231	64	bla_{SHV}

جدول ۲- مقایسه مقاومت آنتی‌بیوتیکی در بین ایزوله‌های جداسازی شده از فاضلاب مراکز درمانی و فاضلاب شهری

Table 2. Comparison of antibiotic resistance in the isolates from urban and hospital wastewater

Antibiotic	Percentage of resistant (hospital wastewater) (%)	Percentage of resistant (urban wastewater) (%)
Cefotaxime	35.38	8.57
Ceftriaxone	29.23	5.71
Ceftazidime	16.92	11.42
Cefepime	10.76	5.71

توالی پرایمرهای استفاده شده برای شناسایی ژن‌های bla_{TEM} و bla_{SHV} و دمای اتصال بهینه شده آنها در جدول ۱ نمایش داده شده است (Weldhagen et al., 2003)، واکنش PCR در حجم نهایی ۲۵ میکرولیتر حاوی ۱۲/۵ میکرولیتر از Master Mix (سیناژن)، ۰/۴ میکرومول از هر پرایمر، ۲ میکرولیتر از DNA استخراج شده (۸۰ پیکوگرم در میکرولیتر) و ۸/۵ میکرولیتر آب دیونیزه انجام گرفت. برنامه زمانی به‌کار رفته برای واکنش PCR برای ژن‌های bla_{TEM} و bla_{SHV} به‌صورت واسرشته‌سازی اولیه در ۹۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۴ دقیقه و سپس در ۴۰ دوره PCR به‌ترتیب واسرشته‌سازی (دناتوراسیون) ۹۵ درجه سلسیوس به‌مدت ۵۰ ثانیه، اتصال پرایمر ۶۰ درجه سلسیوس برای ژن bla_{TEM} و ۶۴ درجه سلسیوس برای ژن bla_{SHV} به‌مدت یک دقیقه و طویل‌سازی در ۷۲ درجه سلسیوس به‌مدت یک دقیقه انجام گرفت.

در نهایت یک مرحله طویل‌سازی نهایی (ادامه سنتز) به‌مدت ۱۰ دقیقه در ۷۲ درجه سلسیوس انجام شد. محصول PCR بر روی ژل آگارز ۱/۲ درصد توسط دستگاه ژل داکیومنتیشن[1] (syngene,UK) مورد بررسی قرار گرفت. تجزیه و تحلیل داده‌ها توسط نرم‌افزار Prism و آزمون P انجام شد.

۳- نتایج و بحث

از مجموع ۱۰۰ ایزوله خالص شده از فاضلاب ۲ مرکز درمانی (بیمارستان البرز و بیمارستان تخت‌جمشید) و فاضلاب شهری در شهر کرج پس از انجام تست‌های تأییدی و افتراقی جنس‌های *اشریشیاکلی*، *کلبسیلا*، *سودوموناس*، *سیتروباکتر*، *پروتئوس*، *شیگلا*، *انتروباکتر*، *یرسینیا* و *سالمونلا* به‌دست آمد.

نتایج تست حساسیت آنتی‌بیوتیکی نشان داد که کمترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مختص به آنتی‌بیوتیک سفپیم (۹ درصد) و بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی مربوط به آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم (۲۶ درصد) می‌باشد. همچنین الگوی مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های جداسازی شده از فاضلاب مراکز درمانی و شهری بررسی شد که در فاضلاب مراکز درمانی بیشترین مقاومت مربوط به سفوتاکسیم (۳۵/۳۸ درصد) و کمترین مقاومت مربوط به سفپیم (۱۰/۷۶ درصد) بوده است. همچنین بیشترین مقاومت آنتی‌بیوتیکی در ایزوله‌های جداسازی شده از فاضلاب شهری مربوط به سفتازیدیم (۱۱/۴۲ درصد) و کمترین مقاومت مربوط به سفتریاکسون و سفپیم (۵/۷۱ درصد) بوده است. همانطور که از نتایج مشخص است، مقاومت به اکثر آنتی بیوتیک‌ها در ایزوله‌های جداسازی شده از فاضلاب‌های مراکز درمانی نسبت به ایزوله‌های جداسازی شده از فاضلاب‌های شهری بیشتر است، البته تجزیه و تحلیل آماری نشان داد که این اختلاف به‌دلیل کم بودن تعداد نمونه‌ها، معنادار نمی‌باشد (جدول ۲).

نتایج آزمایش غربالگری اولیه و تست تأیید فنوتیپی برای شناسایی ایزوله‌های مولد ESBLs نشان داد که از میان ۱۰۰ ایزوله

[1] Gel Documentation

تأیید شده با تست‌های افتراقی، ۱۳ ایزوله تولید کننده ESBLs بودند که از این بین سهم *اشریشیاکلی* ۱۱ ایزوله، *پرتئوس* و *کلبسیلا* هر کدام ۱ ایزوله بود.

در بین ایزوله‌های مولد ESBLs درصد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها سفوتاکسیم، سفتریاکسون، سفتازیدیم و سفپیم به‌ترتیب عبارت بود از ۹۲/۳، ۸۴/۶۱، ۶۱/۵۳ و ۵۳/۸۴ درصد، در حالی که مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های مذکور در بین ایزوله‌های فاقد ESBLs به‌ترتیب ۱۴/۹۴، ۱۱/۴۹، ۸ و ۲/۲۹ درصد به‌دست آمد. بررسی‌های آماری نشان داد که این اختلاف معنی‌دار است ($p<0/05$).

از مجموع ۱۳ ایزوله تأیید شده مولد ESBLs، ۱۲ ایزوله (۹۲/۳ درصد) واجد ژن bla_{TEM} و ۱ ایزوله (۷/۷ درصد) فاقد این ژن بودند. از تعداد ۱۲ ایزوله واجد bla_{TEM}، ۱۱ ایزوله *اشریشیاکلی* (۹۱/۶۶ درصد) و ۱ ایزوله *پروتئوس* (۸/۳۳ درصد) بودند. ۱ ایزوله فاقد این ژن، *کلبسیلا* بود. ۹۲/۳ درصد ایزوله‌های *اشریشیاکلی* شناسایی شده به‌عنوان مولد ESBLs، واجد ژن bla_{TEM} بودند (شکل ۱). از مجموع ۱۳ ایزوله تأیید شده مولد ESBLs، همه ۱۳ ایزوله (۱۰۰درصد) واجد ژن bla_{SHV} بودند (شکل ۲).

این پژوهش روی ایزوله‌های جدا شده از فاضلاب‌های بیمارستانی و شهری انجام شد. ایزوله‌های جداسازی شده مربوط به خانواده *انتروباکتریاسه* بود و تقریباً حدود ۹۰ درصد آنها متعلق به ۵ جنس *اشریشیا*، *کلبسیلا*، *سودوموناس*، *سیتروباکتر* و *پروتئوس* بودند. بیشترین فراوانی مربوط به *اشریشیاکلی* ۷۳ درصد و پس از آن کلبسیلا ۸ درصد بود. در پژوهشی که (Ghane, 2015) بر روی فاضلاب‌های بیمارستانی در اسلامشهر انجام داد سویه‌های غالب به چهار جنس *اشریشیا*، *کلبسیلا*، *سیتروباکتر* و *انتروباکتر* تعلق داشتند. در بین چهار آنتی‌بیوتیک بررسی شده، *انتروباکتریاسه*‌های جداسازی شده از فاضلاب بیمارستانی و شهری بیشترین مقاومت را نسبت به آنتی‌بیوتیک سفوتاکسیم ۲۶ درصد و کمترین مقاومت را نسبت به آنتی‌بیوتیک سفپیم ۹ درصد نشان دادند. درصد مقاومت به سفوتاکسیم در بین ایزوله‌های جداسازی شده از فاضلاب‌های مراکز درمانی ۳۵/۳۸ درصد بود که در مقایسه با نتایج به‌دست آمده توسط قانع ۹۰/۷ درصد پایین‌تر است. در مطالعه (Ghane, 2015)، از مجموع ۱۰۸ سویه *انتروباکتریاسه* که از فاضلاب‌های بیمارستانی جدا شده بود، مشابه پژوهش حاضر

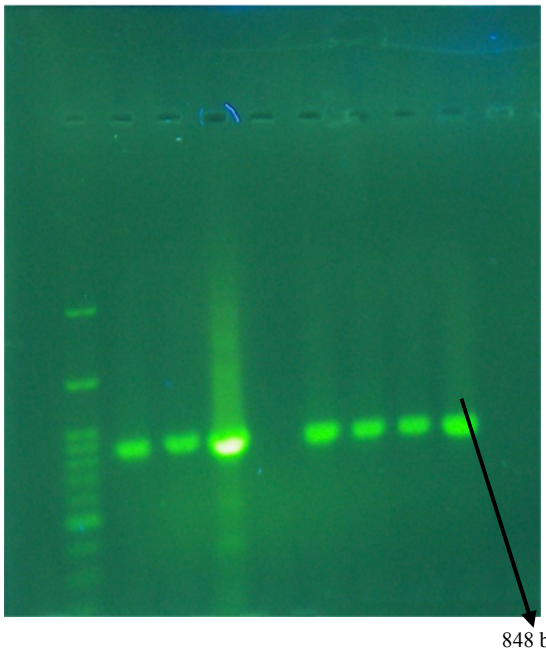

Fig. 1. PCR Amplification of bla_{TEM} Lanes M: 100 bp DNA marker. Lane P: Positive control (*Klebsiella pneumoniae* ATTC 700603). Lanes 1-7: Isolates. Lane N: Negative control.

شکل ۱- الکتروفورز محصول PCR برای تکثیر ژن bla_{TEM}

چاهک M : مارکر 100 bp، چاهک P: کنترل مثبت(کلبسیلا پنومونیه ATCC 700603)، چاهک ۱ تا ۷ : نمونه‌ها، چاهک N: کنترل منفی

بیشترین مقاومت به سفوتاکسیم گزارش شده است هر چند درصد مقاومت در پژوهش ایشان بالاتر بوده است. نتایج این پژوهش نشان داد که مقاومت به اکثر آنتی‌بیوتیک‌ها در ایزوله‌های جداسازی شده از فاضلاب‌های مراکز درمانی نسبت به ایزوله‌های جداسازی شده از فاضلاب‌های شهری بیشتر است که می‌تواند به‌دلیل زیاد بودن غلظت آنتی‌بیوتیک‌ها در فاضلاب‌های بیمارستانی و در نتیجه افزایش شانس تماس باکتری‌ها با آنتی‌بیوتیک‌ها باشد که این مسئله باعث افزایش نگرانی در مورد انتقال افقی ژن‌های مقاوم بین باکتری‌ها شده است.

در پژوهش انجام شده توسط یانگ و همکاران بر روی ۴۳۵ سویه جدا شده از فاضلاب بیمارستانی، *اشریشیاکلی* ۳۲/۹ درصد، *انتروباکتر* ۱۹/۸ درصد، *کلبسیلا* ۱۱/۳ درصد و *سیتروباکتر* ۱۰/۳ درصد سویه‌های غالب بودند. در پژوهش شبانی و همکاران همانند این پژوهش، *اشریشیاکلی* بیشترین سهم را به خود اختصاص داده است. ایشان با بررسی فنوتیپی باکتری *اشریشیاکلی* جداسازی شده از آب‌های زیرزمینی نشان دادند که تنها ۹

dx.doi.org/10.22093/wwj.2019.174603.2841

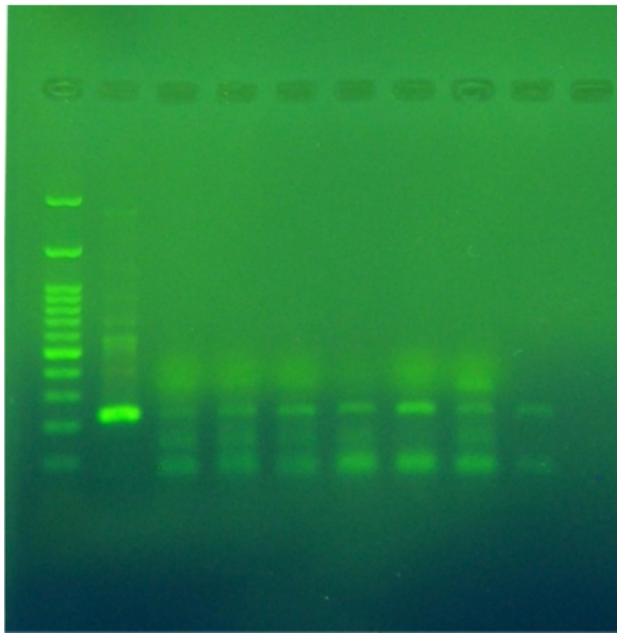

Fig. 2. PCR Amplification of bla_{SHV} Lanes M: 100 bp DNA marker. Lane P: Positive control (*Klebsiella pneumoniae* ATTC 700603). Lanes 1-7: Isolates. Lane N: Negative control.

شکل ۲- نتایج الکتروفورز محصول PCR برای تکثیر ژن bla_{SHV} چاهک M : مارکر 100 bp، چاهک P: کنترل مثبت (*کلبسیلا* پنومونیه ATCC 700603)، چاهک ۱ تا ۷ : نمونه ها، چاهک N: کنترل منفی

درصد ایزوله‌ها مولد ESBLs بودند که نسبت به این پژوهش (۱۳ درصد) کمی کمتر است (Shabani et al., 2018).

در پژوهش چاگاس و همکاران بر روی ۲۲۱ باکتری گرم منفی موجود در فاضلاب بیمارستانی مشخص شد که ۴۰ درصد سویه‌های جدا شده بتالاکتامازهای وسیع‌الطیف را تولید می‌کردند که نسبت به این پژوهش (۱۳ درصد) بیشتر است (Chagas et al., 2011).

مقایسه درصد مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌ها سفوتاکسیم، سفتریاکسون، سفتازیدیم و سفپیم در بین ایزوله‌های مولد ESBLs و فاقد ESBLs، تأیید کننده این مطلب بود که مقاومت به آنتی‌بیوتیک‌های سفالوسپورینی در بین باکتری‌های مولد ESBLs بیشتر است. این نتایج ضرورت استفاده بهینه این نسل از آنتی‌بیوتیک‌ها و جلوگیری از ایجاد فشار محیطی برای تبدیل سویه‌های منفی به سویه‌های مولد ESBLs را نشان می‌دهد.

شیوع ایزوله‌های مولد ESBLs در بین ایزوله‌های جداسازی شده از فاضلاب شهری و بیمارستانی به‌ترتیب عبارت بودند از ۳ درصد و ۷ درصد. در پژوهشی که کورزنیوسکا و همکاران بر روی ایزوله‌های *اشریشیاکلی* جداسازی شده از فاضلاب شهری و بیمارستانی انجام دادند شیوع ایزوله‌های مولد ESBLs به‌ترتیب ۳۷/۱ و ۱۷/۷درصد گزارش شد که بیشتر از این پژوهش بود (Korzeniewska et al., 2013). این تفاوت‌ها می‌تواند به‌علت تفاوت در انواع آنتی بیوتیک‌های مصرفی در بیمارستان‌های مختلف تفاوت‌های ژنتیکی افراد و تفاوت‌های اقتصادی و حتی فرهنگی به ویژه در زمینه فرهنگ استفاده درست از آنتی‌بیوتیک‌ها باشد.

۴- نتیجه‌گیری

مطابق نتایج این پژوهش فاضلاب‌های شهری و بیمارستانی به‌عنوان یکی از مهم‌ترین راه‌های گسترش مقاومت آنتی‌بیوتیکی از انسان به محیط است.

به‌نظر می‌رسد در کنار مصرف بی‌رویه و تجویز نامناسب آنتی‌بیوتیک‌ها، فقدان سیستم‌های مناسب برای تصفیه فاضلاب‌های بیمارستانی می‌تواند عامل مهمی در افزایش گونه‌های باکتریایی مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها به ویژه در محیط‌های آبی شود. از این‌رو ضروری است که فاضلاب‌های بیمارستانی را با استفاده از راهکارهای مؤثر تصفیه کرد.

دفع کنترل نشده فاضلاب‌های شهری و تا حدودی بیمارستانی در شهرهای مختلف ایران به آبهای پذیرنده که به‌عنوان منابع آب آشامیدنی حیوانات و یا منابع آب کشاورزی مورد استفاده قرار می‌گیرند، عامل مهمی است که بر تداوم انتشار گونه‌های باکتریایی مقاوم در برابر آنتی‌بیوتیک‌ها در بین جمعیت‌های انسانی و حیوانات دامن می‌زند. لذا با توجه به این مهم ضروری است که از دفع کنترل نشده فاضلاب‌ها و به‌خصوص فاضلاب‌های بیمارستانی جلوگیری شود.

۵- قدردانی

نویسندگان مقاله به این ترتیب از مساعدت‌های بخش میکروب‌شناسی دانشگاه آزاد اسلامی واحد کرج و کارکنان محترم بیمارستان‌های البرز و تخت جمشید کمال سپاس را دارند.

References

Aali, R., Nikaeen, M., Hatamzadeh, M., Moazeni, M., Khanahmad, H. & Shahryari, A. 2016. The role of hospital wastewaters in dissemination of antibiotic resistant bacteria and resistance genes to the environment. *Journal of Environmental Health Engineering*, 3 (3)**,** 239-248.

Canton, R., Novais, A., Valverde, A., Machado, E., Peixe, L., Baquero, F., et al. 2008. Prevalence and spread of extended-spectrum beta-lactamase-producing *Enterobacteriaceae* in Europe. *Clinical Microbiology and Infections*, 14**,** 144-153.

Chagas, T. P., Seki, L. M., Cury, J. C., Oliveira, J. A., Davila, A. M., Silva, D. M., et al. 2011. Multiresistance, beta-lactamase-encoding genes and bacterial diversity in hospital wastewater in Rio de Janeiro, Brazil. *Journal of Applid Microbiology*, 111 (3)**,** 572-581.

Dzierzanowska, D., Kaminska, W., Semczuk, K., Borowiec, D., Matysiak, M., Szumala-Kakol, A., et al. 2010. Carriage of genes for various extended-spectrum beta-lactamases: a novel resistance strategy of *Klebsiella pneumoniae* in Poland. *International Journal Antimicrobial Agents,* 35**,** 392-395.

Empel, J., Baraniak, A., Literacka, E., Mrówka, A., Fiett, J., Sadowy, E., et al. 2008. Molecular survey of beta-lactamases conferring resistance to newer beta-lactams in *Enterobacteriaceae* isolates from Polish hospitals. *Antimicrobial Agents Chemotherapy,* 52 (7)**,** 2449-2454.

Forbes, B. A., Sahm, D. F. & Weissfeld, A. S. 2007. *Bailey and Scotts' Diagnostic microbiology*, 12th Ed., St. Louis, Mosby.

Ghane, M. 2015. A survey of extended spectrum beta lactamase producing *Enterobacteriaceae* in hospital effluents. *Medical Science Journal of Islamic Azad University, Tehran Medical Branch*, 25(4)**,** 283-288. (In Persian)

Haddadi, A. & Yeke Fallah, F. 2017. Frequency determination of bla_{TEM} & bla_{SHV} in the extended-spectrum beta-lactamase producing *Escherichia* coli isolates from Karaj. *Iranian Journal of Medical Microbiology*, 11**,** 75-80. (In Persian)

Karimi, S., Haddadi, A. & Torabzadeh, P. 2018. In vitro inhibitory effect of alcoholic and aqueous extract of *Vaccinium Arctostaphylos* on ESBLs producing *klebsiella* strains isolated from clinical specimens in Karaj. *Journal of Arak University of Medical Sciences,* 21(2)**,** 75-85. (In Persian)

Korzeniewska, E., Korzeniewska, A. & Harnisz, M. 2013. Antibiotic resistant *Escherichia coli* in hospital and municipal sewage and their emission to the environment. *Ecotoxicology Environmental Safety,* 91**,** 96-102.

Lim, K. T., Yeo, C. C., Yasin, R. M., Balan, G. & Thong, K. L. 2009. Characterization of multidrug-resistant and extended-spectrum beta-lactamase-producing *Klebsiella pneumoniae* strains from Malaysian hospitals. *Journal of Medical Microbiology,* 58 (11)**,** 1463-1469.

Mansouri, S. & Abbasi, S. 2015. Prevalence of multiple drug resistant clinical isolates of extended-spectrum beta-lactamase producing *enterobacteriaceae* in Southeast Iran. *Iranian Journal of Medical Sciences*, 35(2)**,** 101-108. (In Persian)

Nikoogoftar Ranjbar, S., Pourbabaee, A. A. & Davari, K. 2017. The frequency of antibiotic resistant coliforms isolated from sewage of Qom city, Iran. *Qom University Medical Sciences Journal,* 10(10)**,** 69-77. (In Persian)

Prayitno, Kusuma, Z., Yanuwiadi, B. & Laksmono, R. W. 2013. Study of hospital wastewater characteristic in Malang city. *International Journal of Engineering and Science*, 2(2)**,** 13-16.

Shabani, L. N., Shayegh, J. & Sadeghi, J. 2018. Frequency of blatem, blashv, and blactx-m genes encoded extended-spectrum beta-lactamases in *escherichia* coli isolates collected from groundwater in east Azerbaijan province in 2014. *Medical Journal of Tabriz University of Medical Sciences*, 40(2)**,** 58-63. (In Persian)

Shakibaie, M. R., Jalilzadeh, K. A. & Yamakanamardi, S. M. 2009. Horizontal transfer of antibiotic resistance genes among gram negative bacteria in sewage and lake water and influence of some physico-chemical parameters of water on conjugation process. *Journal of Environmental Biology,* 30(1)**,** 45-49.

Takdastan, A., Kordestani, B., Neisi, A. & Jalilzadeh Yangejeh, R. 2017. Determination of biokinetic coefficients for the extended aeration activated sludge system treating hospital effluents in hot climate conditions. *Journal of Water and Wastewater*, 28(2)**,** 97-103. (In Persian)

Wayne, P. A. 2008. *Performance standards for antimicrobial susceptibility testing. 18th Informational Supplement M100-S18*, *Clinical and Laboratory Standards Institue***,** Philadephia, 120-126.

Weldhagen, G. F., Poirel, L. & Nordmann, P. 2003. Ambler class a extended-spectrum beta-lactamases in Pseudomonas aeruginosa: novel developments and clinical impact. *Antimicrobial Agents and Chemotherapy,* 47(8)**,** 2385-2392.

Yang, C. M., Lin, M. F., Liao, P. C., Yeh, H. W., Chang, B. V., Tang, T. K., et al. 2009. Comparison of antimicrobial resistance patterns between clinical and sewage isolates in a regional hospital in Taiwan. *Letters in Applied Microbiology,* 48(5)**,** 560-565.